

05.10.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

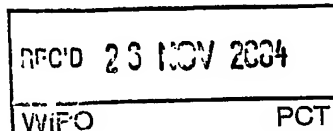
出願年月日 2003年10月 1日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-343747  
Application Number:

[ST. 10/C]: [JP 2003-343747]

出願人  
Applicant(s):

独立行政法人科学技術振興機構  
独立行政法人農業生物資源研究所

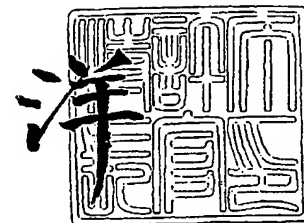


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 A181P89  
【提出日】 平成15年10月 1日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
C12N 15/05  
C12N 15/40

【発明者】  
【住所又は居所】 石川県石川郡野々市町粟田 6 丁目 1 0 7 番地  
【氏名】 森 正之

【発明者】  
【住所又は居所】 石川県石川郡野々市町新庄 3 丁目 9 9 番地 アウルD棟 2 0 8 号  
室  
【氏名】 土肥 浩二

【発明者】  
【住所又は居所】 北海道札幌市東区北 1 9 条東 2 丁目 3 - 6 クルーズハウス北 1  
9 条 2 0 2 号  
【氏名】 錦織 雅樹

【発明者】  
【住所又は居所】 京都府京都市左京区高野東開町 1 - 7 東大路高野第二住宅 3 -  
3 0 3  
【氏名】 玉井 淳史

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2 独立行政法人農業生物資源  
研究所内  
【氏名】 飯 哲夫

【発明者】  
【住所又は居所】 北海道札幌市手稲区前田 2 条 4 丁目 3 - 1 - 8 0 3  
【氏名】 石川 雅之

【特許出願人】  
【持分】 195/200  
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構

【特許出願人】  
【持分】 5/200  
【識別番号】 501167644  
【氏名又は名称】 独立行政法人農業生物資源研究所

【代理人】  
【識別番号】 100080034  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 原 謙三  
【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 003229  
【納付金額】 20,475円

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 1 9 5 / 2 0 0

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1

【物件名】

要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、  
ホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結してなる発現ベクターとが、  
生物由来細胞に導入されていることを特徴とする形質転換細胞。

**【請求項 2】**

前記植物ウイルスが、トバモウイルス属に属するウイルスであることを特徴とする請求項 1 に記載の形質転換細胞。

**【請求項 3】**

前記トバモウイルス属に属するウイルスが、タバコモザイクウイルスまたはトマトモザイクウイルスであることを特徴とする請求項 2 に記載の形質転換細胞。

**【請求項 4】**

前記ホルモンが、ステロイドホルモンであることを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の形質転換細胞。

**【請求項 5】**

前記生物由来細胞が植物由来細胞であることを特徴とする、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の形質転換細胞。

**【請求項 6】**

請求項 5 に記載の植物由来細胞が、タバコ由来細胞であることを特徴とする形質転換細胞。

**【請求項 7】**

請求項 6 に記載のタバコ由来細胞が、タバコ BY-2 細胞であることを特徴とする形質転換細胞。

**【請求項 8】**

上記タンパク質発現用ベクターがアグロバクテリウム法により導入されていることを特徴とする請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の形質転換細胞。

**【請求項 9】**

請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の形質転換細胞を用いることを特徴とするタンパク質の生産方法。

**【請求項 10】**

前記タンパク質の生産方法であって、形質転換細胞の培養工程を含むことを特徴とする請求項 9 に記載のタンパク質の生産方法。

**【請求項 11】**

前記のタンパク質の生産方法であって、さらにホルモンによる転写誘導工程を含むことを特徴とする請求項 10 に記載のタンパク質の生産方法。

**【請求項 12】**

前記ホルモンによる転写誘導工程が、ステロイドホルモンによる転写誘導工程であることを特徴とする請求項 11 に記載のタンパク質の生産方法。

**【請求項 13】**

請求項 9 ないし 12 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の生産方法を行うためのタンパク質生産キット。

**【請求項 14】**

前記タンパク質の生産キットであって、請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含むことを特徴とする請求項 13 に記載のタンパク質生産キット。

**【請求項 15】**

前記タンパク質の生産キットであって、さらにホルモンを含むことを特徴とする請求項 13 または 14 に記載のタンパク質生産キット。

**【請求項 16】**

前記ホルモンがステロイドホルモンであることを特徴とする請求項 15 に記載のタンパク質生産キット。

ク質生産キット。

【請求項 17】

前記タンパク質の生産キットであって、さらに宿主となる生物由来細胞が含まれていること特徴とする請求項 13 ないし 16 のいずれか 1 項に記載のタンパク質生産キット。

【請求項 18】

前記生物由来細胞が、植物由来細胞であることを特徴とする請求項 17 に記載のタンパク質生産キット。

【請求項 19】

前記植物由来細胞が、タバコ由来細胞であることを特徴とする請求項 18 に記載のタンパク質生産キット。

【請求項 20】

前記タバコ由来細胞が、タバコ BY-2 細胞であることを特徴とする請求項 19 に記載のタンパク質生産キット。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】形質転換細胞、および該細胞を用いたタンパク質の生産方法、並びにタンパク質生産キット

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含み、ウイルス抵抗性反応（サイレンシング反応）のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、ホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結してなる発現ベクターが導入されていることを特徴とする形質転換細胞、および該形質転換細胞を用いたタンパク質の生産方法、並びに該タンパク質の生産方法を行うためのキットに関するものである。

## 【0002】

より具体的には、発現させようとするタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応（サイレンシング反応）に対するサプレッサーを有するトマトモザイクウイルス（以下適宜 T o M V と略す）の遺伝子と、ステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結してなる発現ベクターを、アグロバクテリウム法により導入されてなる形質転換タバコ B Y - 2 細胞、および該形質転換タバコ B Y - 2 細胞を用いたタンパク質の生産方法、並びに該タンパク質の生産方法を行うためのキットに関するものである。

## 【背景技術】

## 【0003】

近年、医薬品をはじめとする有用タンパク質の効率的生産方法の開発が注目されている。特に植物を食糧のみならず、医薬品をはじめとする有用タンパク質の生産工場として利用することを目指し、開発が進められている。このような試みは、「分子農業」と呼ばれ次世代農業として期待されている。

## 【0004】

現在植物における有用タンパク質の生産は、形質転換植物を用いる方法（例えば非特許文献 5 参照）と、ウイルスベクターを植物に感染させる方法のいずれかで行われている（例えば、非特許文献 1 および 2 参照）。

## 【0005】

本発明者は、これまでに植物ウイルス（ブロムモザイクウイルス）の複製酵素遺伝子と、これにより増幅される有用タンパク質遺伝子とともに植物の染色体内に組み込むことができ、複製酵素遺伝子の発現を制御することにより、有用タンパク質を合成することができる遺伝子発現系（以下高効率 m R N A 誘導増幅系と称する）を構築した。当該高効率 m R N A 誘導増幅系を、ニコチニアベンサミアーナ植物に適用し、複製酵素のサブユニットの一つである 1 a タンパク質をステロイドホルモン制御系で誘導発現することによって、ガンマイインターフェロン遺伝子を R N A レベルで増幅することが可能となった（非特許文献 1 および 2 参照）。

## 【0006】

さらに本発明者は、ウイルス抵抗性反応（サイレンシング反応）に対するサプレッサーを持ち、かつ複製能力の高い一本鎖 R N A ウイルスであるトバモモザイクウイルス属であるトマトモザイクウイルス（T o M V）をベクターとし、ステロイドホルモンによる誘導によって、高効率に外来タンパク質の m R N A を増幅する系の構築を行った。当該系をニコチニアベンサミアーナ植物に適用し、Green Fluorescent Protein 遺伝子（以下 G F P 遺伝子と称す）をレポーター遺伝子として、ステロイドホルモン制御系で誘導発現を試みた結果、該遺伝子の R N A レベルでの増幅、および G F P の発現が確認できた（非特許文献 2 参照）。

## 【0007】

一方、植物由来培養細胞を用いた有用タンパク質生産も試みられている。例えば、非特許文献 3 においては、カリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモーターを用いたタバコ B Y - 2 細胞における組み換えタンパク質の生産が報告されている。また、非特許文献 4 においては、タバコモザイクウイルス（以下 T M V と称す）の外被タンパク質遺伝子の 3

、末端に目的とするペプチド遺伝子を連結した変異型ウイルスRNAベクターを用いて、プロトプラスト化したタバコBY-2細胞に接種させ、外被タンパク質との融合タンパク質を発現させている。

【非特許文献1】石川県農業短期大学付属農業資源研究所平成12年度年報、No. 9, 2000, p. 16-18 (発行日:平成13年10月25日)

【非特許文献2】石川県農業短期大学付属農業資源研究所平成13年度年報、No. 10, 2001, p. 13-16 (発行日:平成14年9月25日)

【非特許文献3】Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R. "Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells." Plant Mol Biol. 1995 Mar; 27(6): 1163-72.

【非特許文献4】Takamatsu N, Watanabe Y, Yanagi H, Meshi T, Shiba T, Okada Y. "Production of enkephalin in tobacco protoplasts using tobacco mosaic virus RNA vector." FEBS Lett. 1990 Aug 20; 269(1): 73-6.

【非特許文献5】Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals Glynis Giddings, Gordon Allison, Douglas Brooks & Adrian Carter Nature Biotechnology (2000) 18: 1151 - 1155.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

前記植物におけるタンパク質の生産方法のうち、形質転換植物を用いる方法では、植物を栽培するのみでタンパク質の生産が可能であるが、1細胞あたりの生産効率は著しく低いという問題点がある。一方ウイルスベクターを植物に感染させる方法は、高い生産効率を有するが、接種作業が必要なため作業効率が悪いこと、およびウイルスの外界への飛散等の安全性の問題により大規模生産化が困難となっている。

【0009】

また前述の本発明者が構築したプロモモザイクウイルスを用いた高効率mRNA誘導増幅系の場合は、プロモモザイクウイルスにウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)に対するサプレッサーが存在しないため、粒子化できない組み換えウイルスを用いた場合は、サイレンシング反応(ウイルス抵抗性反応)によりウイルスRNAが分解されてしまう。つまり、プロモモザイクウイルスを用いた高効率mRNA誘導増幅系には、当該目的タンパク質をコードする遺伝子はRNAレベルで増幅するものの、時間の経過とともに該RNAがウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)によって分解されてしまい、継続的なタンパク質の高生産が行えないという欠点がある。さらに当該系においては、ステロイドホルモンで活性化された転写因子が、植物の黄化等を引き起こし植物の生長に悪影響を及ぼすという欠点も有している。

【0010】

一方、ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)に対するサプレッサーを有するTOMVを用いた系によって、植物個体内でタンパク質を生産する場合は、サイレンシングによるRNAの分解は回避でき高効率にタンパク質を生産することが可能であったが、植物の栽培設備等が必要でありスケールアップが困難であること、植物の生産には比較的長期間を要すること、形質転換植物個体の種子や花粉等の飛散による安全性に対する問題、操作が煩雑であること等、様々な欠点を有している。

【0011】

その他、非特許文献3および4に挙げたタバコBY-2細胞を用いたタンパク質生産系は、培地における細胞培養によってタンパク質を生産することができ、スケールアップは容易であり、また増殖速度が高いために時間的メリットが大きい。さらに培養細胞であるため、例えば外界に漏洩した場合であってもすぐに死滅してしまうために安全性の面においても優れている。しかしながら、これらの方法においても、生産効率が低い、操作が煩雑である(プロトプラスト化、接種操作)等の問題点を有している。

【0012】

以上説示したごとく、従来の植物および植物由来細胞を用いたタンパク質の生産方法、およびタンパク質の生産系は、種々の欠点を有し、決して満足のいくものとはなっていないかった。

【0013】

本発明は、上記従来の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、形質転換植物によるタンパク質生産の利点と、ウイルスベクターを用いたタンパク質生産の利点を併せ持つタンパク質の生産系、つまり大規模生産能力、高い生産効率、および安全性の高いタンパク質の生産系、および生産方法等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明らは、上記の課題を解決するために、鋭意検討を重ねた結果、ステロイドホルモンで転写誘導をすることができるプロモーターの下流に、外被タンパク質遺伝子をGFP遺伝子に置換した組み換えTOMVのcDNAを導入して構築した発現ベクターを、タバコBY-2細胞に導入した形質転換タバコBY-2細胞について、ステロイドホルモンによる転写誘導を行った結果、確かなウイルスRNAの増幅、GFPの誘導発現ができることを発見し、本発明を完成させるに至った。

【0015】

すなわち本発明は、以下の発明を包含する。

【0016】

(1) 発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、ホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結してなる発現ベクターが、生物由来細胞に導入されていることを特徴とする形質転換細胞。

【0017】

(2) 前記植物ウイルスが、トバモウイルス属に属するウイルスであることを特徴とする(1)に記載の形質転換細胞。

【0018】

(3) 前記トバモウイルス属に属するウイルスが、タバコモザイクウイルスまたはトマモザイクウイルスであることを特徴とする(2)に記載の形質転換細胞。

【0019】

(4) 前記ホルモンが、ステロイドホルモンであることを特徴とする(1)ないし(3)のいずれかに記載の形質転換細胞。

【0020】

(5) 前記生物由来細胞が植物由来細胞であることを特徴とする、(1)ないし(4)のいずれかに記載の形質転換細胞。

【0021】

(6) 上記(5)の植物由来細胞が、タバコ由来細胞であることを特徴とする形質転換細胞。

【0022】

(7) 上記(6)のタバコ由来細胞が、タバコBY-2細胞であることを特徴とする形質転換細胞。

【0023】

(8) 上記タンパク質発現用ベクターがアグロバクテリウム法により導入されていることを特徴とする(1)ないし(7)のいずれかに記載の形質転換細胞。

【0024】

(9) 上記(1)ないし(8)のいずれかの形質転換細胞を用いることを特徴とするタンパク質の生産方法。

【0025】

(10) 前記タンパク質の生産方法であって、形質転換細胞の培養工程を含むことを特徴とする(9)に記載のタンパク質の生産方法。



**【0026】**

(11) 前記のタンパク質の生産方法であって、さらにホルモンによる転写誘導工程を含むことを特徴とする(10)に記載のタンパク質の生産方法。

**【0027】**

(12) 前記ホルモンによる転写誘導工程が、ステロイドホルモンによる転写誘導工程であることを特徴とする(11)に記載のタンパク質の生産方法。

**【0028】**

(13) 上記(9)ないし(12)のいずれかのタンパク質の生産方法を行うためのタンパク質生産キット。

**【0029】**

(14) 前記タンパク質の生産キットであって、(1)ないし(8)のいずれかに記載の発現ベクターを含むことを特徴とする(13)に記載のタンパク質生産キット。

**【0030】**

(15) 前記タンパク質の生産キットであって、さらにホルモンを含むことを特徴とする(13)または(14)に記載のタンパク質生産キット。

**【0031】**

(16) 前記ホルモンがステロイドホルモンであることを特徴とする(15)に記載のタンパク質生産キット。

**【0032】**

(17) 前記タンパク質の生産キットであって、さらに宿主となる生物由来細胞が含まれていること特徴とする(13)ないし(16)のいずれかに記載のタンパク質生産キット。

**【0033】**

(18) 前記生物由来細胞が、植物由来細胞であることを特徴とする(17)に記載のタンパク質生産キット。

**【0034】**

(19) 前記植物由来細胞が、タバコ由来細胞であることを特徴とする(18)に記載のタンパク質生産キット。

**【0035】**

(20) 前記タバコ由来細胞が、タバコBY-2細胞であることを特徴とする(19)に記載のタンパク質生産キット。

**【発明の効果】****【0036】**

上記のように本発明にかかる形質転換体は、発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、ホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結してなる発現ベクターが、生物由来細胞に導入されていることを特徴とする形質転換細胞という構成である。

**【0037】**

また同じく本発明にかかるタンパク質の生産方法は、上記本発明にかかる形質転換細胞を用いてなり、好ましくは該細胞の培養工程、およびホルモンによる転写誘導工程により構成されている。

**【0038】**

また本発明にかかるタンパク質生産キットは、上記本発明にかかるタンパク質生産方法を行うためにキットであり、好ましくは上記発現ベクター、転写誘導を行うためのホルモン、および発現ベクターが導入される宿主となる細胞により構成されている。

**【0039】**

上記構成によれば、発現タンパク質をコードする遺伝子のmRNAをウイルスの高い複製能力によって高度に増幅することができる。また該mRNAは、ウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有するウイルスに起因して増幅されているため、宿主細胞のウイルス抵抗性反応によって分解が抑制される。そのため継続的に目的タンパク質を高生産することが

できる。さらに発現ベクターが導入された宿主が生物個体でなく生物由来細胞であるため、培養は液体培養で行うことが可能であり、また培養スケールの増大が安価かつ容易である。また、形質転換細胞は、自生することができず、万一該形質転換細胞が外界に漏洩した場合であっても死滅するため安全であるといえる。

#### 【0040】

よって、本発明にかかる形質転換細胞、本発明にかかるタンパク質生産方法、および本発明にかかるタンパク質生産キットは、大規模生産能力および高い生産効率を有し、さらに安全性の高いタンパク質の生産が可能となるという効果を奏する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0041】

本発明の実施の一形態について説明すれば、以下のとおりである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 【0042】

本発明は、(A) 発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、ホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結して構築した発現ベクターが生物由来細胞に導入されてなる形質転換細胞(以下本発明にかかる形質転換細胞と称する)、(B) 該形質転換細胞を用いたタンパク質の生産方法(以下本発明にかかるタンパク質生産方法と称する)、および(C) 該タンパク質の生産方法を行うためのキット(以下本発明にかかるタンパク質生産キットと称する)に関するものである。

#### 【0043】

以下各発明についてそれぞれ説明する。

#### 【0044】

##### (A) 本発明にかかる形質転換細胞

本発明にかかる形質転換細胞は、発現させるタンパク質をコードする遺伝子を含むウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子と、ホルモンで転写誘導されるプロモーターとを連結して構築した発現ベクターが生物由来細胞に導入されてなるものである。

#### 【0045】

＜ウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有する植物ウイルス＞

ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)とは、線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒト、および植物等の種々の生物が備えている、その生命活動に不適切なRNAを効率的に排除する機能の一つであり、特に生物におけるウイルス感染に対する防御機構のことをいう。

#### 【0046】

より具体的には、生物にウイルスが感染すると、生物細胞にとって好ましくないウイルス由来のRNA(mRNAやウイルスゲノムRNA)が多量に生産される。このためウイルスに感染した生物細胞は、ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)を機能させ、かかるウイルス由来RNAを駆逐し、ウイルス感染の拡大を防いでいる。

#### 【0047】

これに対して、多くのウイルスは、生物細胞におけるウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)を抑制する能力を備えている。すなわちウイルスは、ウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)による増殖抑制に対抗すべく、それに対するサプレッサー(抑制因子)を発現させる。

#### 【0048】

本発明にかかる形質転換細胞は、植物ウイルスの遺伝子を含む発現ベクターを導入することによりなり、最終的には該ベクターに含まれる目的タンパク質の発現に用いるため、上述のウイルス抵抗性反応(サイレンシング反応)に対するサプレッサー(以下単にサプレッサーと称する)を有する必要がある。

#### 【0049】

本発明に用いる植物ウイルスが、かかるサプレッサーを有しなければ、前述の従来技術に掲げたごとく、目的タンパク質の遺伝子がmRNAレベルで増幅したにも関わらず、時間の経過とともに該RNAがウイルス抵抗性反応（サイレンシング反応）によって分解されてしまい、継続的なタンパク質生産が行えないということとなる。

#### 【0050】

よって、本発明において用いる植物ウイルスは、サプレッサーを有することが好ましい。

#### 【0051】

ここで、本発明で用いるサプレッサーを有する植物ウイルスとしては、特に限定されるものではないが、例えば、ポティ属（Potyvirus属）ウイルス、ククモウイルス属（Cucumovirus属）ウイルス（例えばキュウリモザイクウイルス（CMVと略す））、ポテックスウイルス属（Potexvirus属）ウイルス（例えばジャガイモXウイルス（PVXと略す））、トンプスウイルス属（Tombusvirus属）ウイルス（例えばトマトブッシースタントウイルス（TBSVと略す）、Cymbidium ringspot virus（CymRSVと略す））、カルモウイルス属（Carmovirus属）ウイルス（例えば、Turnip rinkle virus（TCVと略す））、タバモウイルス属（Tobamovirus属）ウイルス（例えば、タバコモザイクウイルス（TMVと略す）、トマトモザイクウイルス（ToMVと略す））が挙げられる。

#### 【0052】

後述する実施例において、ToMVを用いて発現ベクターを構築しているが、当該ウイルスは、(ア)他のウイルスと比較して増殖能が高く、タンパク質の大量生産が期待できること、(イ)該実施例において宿主として用いたタバコBY-2細胞での増殖能が高いこと、および(ウ)従来から広く使用されており、取り扱い性、汎用性、応用性に富むという理由から採用した。

#### 【0053】

上記サプレッサーを有する植物ウイルスを用いることによって、増幅した目的タンパク質のmRNAは、ウイルス抵抗性反応（サイレンシング反応）によって分解されることなく、継続的なタンパク質の高生産が行うことが可能である。

#### 【0054】

なお、ここで植物ウイルスとは、植物を宿主とするウイルスの総称であり、狭義には、高等植物のウイルスを指す。ウイルスに感染した植物は、モザイク、退緑、黄化、奇形、巻葉、矮化、壊死などのウイルスの種類と寄生植物の組み合わせによって、種々の異なる病徴を示し、栽培作物の品質や、収穫に甚大な被害を与える。ウイルスの伝播様式には、汁液伝播、虫媒伝播、土壌伝播、接木伝播、種子伝播などがある。ある種のウイルスは、媒介昆虫体内でも増殖し、経卵伝染するものもある。

#### 【0055】

##### <発現ベクターの構築>

発現させる目的タンパク質は、生物由来細胞中で発現可能であるタンパク質であれば、特に限定されるものではない。例えば、医薬品に利用可能な有用酵素、インターフェロン、アレルゲンタンパク質、病原体の抗原、エリスロポエチン、エンケファリン、細胞増殖因子、抗体（免疫グロブリン）、アルブミン等が挙げられる。上記タンパク質が発現した生物由来細胞を適量摂取することにより、該タンパク質を摂取するのと同様の効果が得られるといった医薬品としての利用が可能となる。

#### 【0056】

発現させる目的タンパク質をコードする遺伝子は、前述のサプレッサーを有する植物ウイルスの遺伝子の一部との置換、または該ウイルスの遺伝子に連結するなど通常の遺伝子組み換え技術を用いて導入すればよい。

#### 【0057】

本発明にかかる形質転換細胞に導入する発現ベクターは、上記目的タンパク質をコードする遺伝子が導入された組み換え植物ウイルスの遺伝子を、ホルモンで転写誘導されるプロモーターの下流に連結して構築すればよい。かかるホルモンで誘導されるプロモーター

を用いることによって、その下流に連結した植物ウイルス由来のタンパク質が高効率に誘導発現される。

#### 【0058】

かかるプロモーターおよびベースとなるベクターは特に限定されるものではなく、従来公知のプロモーターおよびベクターを用いればよい。例えば、ステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターを持つTiプラスミドpTA7001 (McNellis TW, Mudgett M B, Li K, Aoyama T, Horvath D, Chua NH, Staskawicz BJ. Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic Arabidopsis induces hypersensitive cell death. Plant J. 1998 Apr;14(2):247-57. 参照) から本発明者等が構築したpTA7001 (Stu)、およびエストロジェンで転写誘導されるプロモーターを持つTiプラスミドpER8 (Zuo, J., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. Plant J. 24, 265-273. 参照) 等を好適に用いることができる。また、その他形質転換用のベクターの例としては、他の形質転換用ベクターとしては、エクジソンで転写誘導されるプロモーターを持つプラスミド、pES60およびpES46 (The Plant Journal (1999) 19: 97-106. Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants Alberto Martinez, Caroline Sparks, Cliff A. Hart, John Thompson and Ian Jepson) がある。

#### 【0059】

また該発現ベクターには、プロモーターの転写因子を含んでいることが好ましい。転写因子によって、プロモーターの下流に連結した植物ウイルスの遺伝子の転写調節が行われ、さらに高効率に転写を誘導することが可能となるからである。該転写因子は、使用するプロモーターに対応して選択すればよい。例えば、前述のステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターを持つTiプラスミドpTA7001 (Stu) を用いた場合の転写因子はGVGであり、エストロジェンで転写誘導されるプロモーターを持つTiプラスミドpER8を用いた場合は、XVEである。

#### 【0060】

また該発現ベクターには、その他種々のDNAセグメントが含まれていてもよい。DNAセグメントとしては、例えば、ターミネーターを挙げることができる。また、必要に応じて、キメラタンパク質を発現させるために、他のタンパク質をコードする遺伝子や、このような遺伝子を導入するための制限酵素認識部位 (マルチクローニングサイト等) を含んでいてもよい。

#### 【0061】

上記発現ベクターを構築する方法 (作製方法) は具体的には特に限定されるものではなく、組み換えウイルス遺伝子およびプロモーター等のDNAセグメントと、上述したベースとなるベクターとを、公知の組換えDNA技術を用いてつなげればよい。また、構築された発現ベクターの増殖方法 (生産方法) も特に限定されるものではなく、公知の方法を用いることができる。一般的には大腸菌を宿主として当該大腸菌細胞内で増殖させればよい。このときベクターの種類に応じて、好ましい大腸菌の種類を選択してもよい。

#### 【0062】

##### <形質転換方法>

構築された発現ベクターを宿主 (宿主) となる植物由来細胞へ導入する具体的な手法は特に限定されるものではなく、宿主となる植物由来細胞の種類に応じた適切な形質転換方法を用いればよい。植物由来細胞への一般的な形質転換法としては、アグロバクテリウムを用いた形質転換法 (アグロバクテリウム法) を挙げることができ、後述する実施例に示すように、本発明でもアグロバクテリウム法を好適に用いることができる。またその他パーティクルガンによる方法、プロトプラスト/スフェロプラスト法、エレクトロポレーション法 (電気穿孔法)、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。

#### 【0063】

組み換え植物ウイルス遺伝子（発現ベクター）が宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認する方法は、特に限定されるものではなく、公知の各種の方法を用いることができる。具体的には、各種マーカーを用いればよい。例えば、宿主細胞中で欠失している遺伝子をマーカーとして用い、このマーカーと組み換え植物ウイルス遺伝子とを含むプラスミド等を発現ベクターとして宿主細胞に導入する。これによってマーカー遺伝子の発現から本発明の遺伝子の導入を確認することができる。

#### 【0064】

例えば後述する実施例においては、薬剤耐性マーカー（ハイグロマイシン耐性遺伝子、 $\text{Hyg}^r$ ）を用いており、ハイグロマイシンを含有する培地中で、形質転換候補株を培養することにより、生育してきた細胞株を形質転換体として選抜することが可能となる。その他のマーカーとしては、ピアラホス耐性マーカー、カナマイシン耐性マーカー等が植物細胞の選抜に有効であり、ピューロマイシン耐性マーカー、ブレオマイシン耐性マーカー、XGPR T 遺伝子、DHFR 遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子等が動物細胞の選抜には有効である。さらに酵母などでは、ウラシル要求性マーカーをはじめとする栄養要求性マーカーを選抜に用いることができる。但しこれら形質転換体の選抜方法は、限定されるものではなく、発現ベクターを導入する宿主等に応じて適宜選択して用いればよい。

#### 【0065】

その他、宿主細胞から調製したゲノムDNAを鋳型とし、導入したタンパク質の遺伝子全長を特異的に増幅するいわゆるジェノミックPCR法を挙げることができる。この方法によって、目的タンパク質をコードする遺伝子が増幅されてくることを電気泳動法等によって確認できれば、該遺伝子の導入を確認することができる。

#### 【0066】

また、その他の方法としては、あるいは、目的タンパク質を融合タンパク質として発現させてもよく、例えば、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質GFP (Green Fluorescent Protein) をマーカーとして用い、目的タンパク質をGFP融合タンパク質として発現させてもよい。さらに、発現ベクターには、形質転換植物細胞における発現部位を可視化してモニターするための遺伝子を導入することもできる。このような遺伝子の一例としては、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を挙げることができる。

#### 【0067】

##### <宿主細胞>

また、発現ベクターが導入される宿主細胞としては、生物由来細胞であれば特に限定されるものではなく、動物由来細胞であっても植物由来細胞であってもよい。ただし、植物由来細胞は、動物由来細胞に比して、増殖速度が速くコンタミネーションのリスクが少ない点、培地作成費用が非常に安価であるという点において、植物由来細胞がより好ましい。ここで、動物由来細胞、および植物由来細胞とは、それぞれ動物個体、および植物個体を除く細胞、組織、並びに器官も含む意味である。特に液体培地等で培養可能な細胞が好ましい。

#### 【0068】

また由来となる動物としては、特に限定されるものでないが、ヒト、サル、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、チャイニーズハムスター、ウシ、ウマ、ブタ、メダカやゼブラフィッシュ等の魚類、カイコ、夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 等が挙げられる。また由来となる植物としては、特に限定されるものではないが、イネ、シロイナズナ、オオムギ、コムギ、タバコ、トマト、キュウリ、ダイズ、ジャガイモ、トウモロコシ、ニチニチソウ、シロイヌナズナ、アルファルファが挙げられる。

#### 【0069】

その他、枯草菌や乳酸菌などの菌類、酵母など単細胞生物が宿主細胞として利用できる。

#### 【0070】

また動物由来細胞の例としては特に限定されるものではないが、HeLa細胞、CHO

細胞、メラノーマ細胞、マウス 3T3 細胞が挙げられる。また植物由来細胞の例としては、タバコ BY-2 細胞、ジャガイモ由来、イネ由来、サツマイモ由来、ダイズ由来、パセリ由来、シロイヌナズナ由来、コムギ由来、トウモロコシ由来細胞、ニチニチソウ由来細胞が挙げられる。

#### 【0071】

後述する実施例において、タバコ BY-2 細胞を宿主として用いている。タバコ BY-2 細胞 (Toshiyuki nagata, Yasuyuki Nemoto, and Seiichiro Hasezawa "Tobacco BY-2 Cell Line as the "Hela" Cell in the Cell Biology of Higher Plants" International Review of cytology, vol.132, p.p. 1-30 (1992)、および <http://www.riken.go.jp/r-wprld/info/release/press/2003/030620/> 参照) は、植物培養細胞株としては、世界中で最も広く用いられているものであり、最も増殖速度が速いこと、遺伝子操作が容易なこと、大量培養を容易に行うことができるという理由から採用した。

#### 【0072】

また本発明において植物個体ではなく、植物由来細胞を宿主としているが、それは以下に示す利点を有するからである。

#### 【0073】

(a) 植物個体を宿主とする場合と比較して、増殖速度が速く、形質転換細胞を短期間で増殖することができる。また大規模化、大量生産も容易である。

#### 【0074】

(b) 植物個体を宿主とする場合と比較して、生育させるための広大なスペース、施設(畑、温室)等を必要としない。また培養装置を容易に大型化することが可能である。

#### 【0075】

(c) 植物個体を宿主とする場合と比較して、カルスから植物個体を分化させる工程、花を咲かせて種子をとる工程、該種子を蒔いて増殖させるという工程が無い場合、形質転換体の作成、スクリーニング、タンパク質生産の期間を著しく短縮することができる。

#### 【0076】

(d) 化学物質等の誘導物質によるタンパク質誘導発現が簡便に行うことができる。植物個体を宿主とする場合は、植物個体に化学物質等を直接塗布、散布等の方法によって、該植物個体全体に均一に投与する必要があるが、非常に手間と時間がかかる。一方、植物由来細胞を宿主とした場合は、細胞培養の際に、該誘導物質等を培地中に添加するだけで足り、前細胞に対して、同時かつ均一に誘導をかけることが可能となる。

#### 【0077】

(e) 植物個体は、蒸散作用等によって厳密な表面温度の管理が困難であるが、液体培地中で生育する培養細胞の場合は、温度管理等が容易である。環境条件の変化等による種々のストレスに感受性の高いプロモーターを用いた際に、安定的にタンパク質の生産が行うことが可能である。

#### 【0078】

(f) 種々の組織からなる植物個体とは異なり、培養細胞は均質であるため、組織特異的な影響が無く、タンパク質の発現コントロールが容易である。

#### 【0079】

(g) 細胞周期を高度に同調化できるため、厳密なタンパク質発現をコントロールすることが可能となる。

#### 【0080】

(h) 液体培養であるため、分泌型タンパク質を培地中に分泌させることによって、タンパク質の回収、精製が容易である。また、目的タンパク質が、分泌型タンパク質でない場合であっても、分泌型のタグを目的タンパク質に付加することによって、同様の効果が得られる。

#### 【0081】

(i) 植物個体と異なり、培養細胞は生育に光を必要としないため、照明設備、および照明にかかるコストを削減することが可能である。また、光に感受性なタンパク質を発現さ

せる場合にも有利である。

【0082】

(j)培地中に種々の化学物質等を添加することによって、生産するタンパク質を化学修飾することが可能である。例えば、放射性同位元素を添加することによって、放射性標識がされたタンパク質を容易に作成することが可能となる。

【0083】

(k)形質転換体が外界に漏出した場合であっても、植物個体とは異なり自生することができず、死滅するために安全である。このことにより、植物個体、種子、花粉等の飛散防止、安全性試験、遺伝子組み換え生物に対するリスク管理に要する設備、費用、時間が軽減できる。

【0084】

(B) 本発明にかかるタンパク質生産方法

本発明にかかるタンパク質生産方法は、前述の本発明にかかる形質転換細胞を用いて行われる。本発明にかかるタンパク質の生産工程においては、形質転換の際に取得した形質転換細胞を培養せずに細胞中のタンパク質を取得してもよい。しかし、本発明にかかるタンパク質生産方法には、本発明にかかる形質転換細胞を培養する工程（以下細胞培養工程と称する）が含まれていることが好ましい。かかる培養工程によって、目的タンパク質をコードする遺伝子が導入された形質転換細胞数を増加させることができ、該タンパク質の生産量を増加させることが可能となるからである。

【0085】

かかる細胞培養工程における細胞培養の方法は特に限定されるものではなく、培養する細胞に好適な培地、培養条件を適用して行えばよい。植物細胞を培養する際の培地としては、限定されるものではないが、無機塩類、炭素源、ビタミン類、アミノ酸が加えられている場合がある。さらに、ココナツミルクや酵母エキスを加えて成長を促進させる場合がある。その他、オーキシシンとサイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン等の植物ホルモンを添加する場合がある。また培養条件であるが、光、温度、通気の有無等を培養する細胞に応じて最適なものを採用すればよい。例えば、後述する実施例において、タバコBY-2細胞を培養する際には、370mg/lリン酸二水素カリウム、1mg/lチアミン塩酸、3%スクロース、0.2mg/l 2, 4-Dを含むMS培地を用い、暗所、26℃、135回転/分で旋回振盪培養後、1/100量を一週間ごとに継代している。

【0086】

一方、動物細胞を培養する際の培地としては、限定されるわけではないが、アミノ酸、ビタミン類、ブドウ糖、塩類に、血清が加えられている場合がある。その他、緩衝液として重炭酸/炭酸ガス系緩衝液が用いられており、培養器として、CO<sub>2</sub>インキュベーターが用いられている。またpHのモニター用にフェノールレッドを添加する場合がある。培養条件は、一般的には37℃で培養するが、細胞株によっては、28℃、40℃の場合がある。

【0087】

本発明にかかるタンパク質生産方法においては、上記細胞培養工程に加えさらに、培養された細胞に対して、ホルモンによる転写誘導を行う工程（以下転写誘導工程）が含まれることが好ましい。前述の本発明にかかる形質転換細胞に導入された発現ベクターには、ホルモンで転写誘導されるプロモーターが含まれているため、該転写誘導工程によって、目的タンパク質をコードする遺伝子の転写の開始、転写量の増加およびコントロール等が可能となり、タンパク質の生産量の増加、タンパク質の生産量のコントロールができる。

【0088】

本転写誘導工程に用いるホルモンは特に限定されるものではなく、本発明にかかる形質転換細胞に導入された発現ベクターに含まれるプロモーターに応じて、適宜選択すればよい。例えば、ステロイドホルモン、エストロジェン、エクジソン等があるこの他、エタノールなどが転写誘導に利用できる。



## 【0089】

後述の実施例においては、ステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターを持つ Ti プラスミド pTA7001 (Stu) をベースとしてタンパク発現ベクターを構築していることから、ステロイドホルモンによって誘導を行っている。

## 【0090】

また本転写誘導工程に用いるホルモンの量については、プロモーターの種類、細胞株の種類、細胞株の培養フェーズ、細胞の培養条件等に応じて適宜選択すればよい。例えば、後述する実施例においては、 $30\mu\text{M}$ の濃度のステロイドホルモン（デキサメタゾン）を用いて本転写誘導工程を行っている。

## 【0091】

さらに本転写誘導工程を行う時期についても、特に限定されるものではなく、細胞株の種類、細胞株の培養フェーズ、細胞の培養条件等に応じて適宜選択すればよい。例えば後述する実施例においては、継代培養後5日目において転写誘導を行った場合が最もレポータータンパク質である GFP を発現した細胞の割合が高いという結果であった。このことより、本実施例の条件においては、前培養5日目における培養細胞の生理的条件が、転写誘導とタンパク質の発現に適していたことがいえる。

## 【0092】

(C) 本発明にかかるタンパク質生産キット

本発明にかかるタンパク質生産キットは、前記本発明にかかるタンパク質生産方法を行うことができる試薬、器具、装置等が含まれていればよく、特に限定されるものではないが、本発明にかかる形質転換細胞に導入されている発現ベクターを含んでいることが好ましい。この場合は、該発現ベクターに発現しようとする目的タンパク質をコードする遺伝子を、連結または置換等の通常の遺伝子組み換え技術を用いて導入することで、目的タンパク質の生産を行うことが可能となる。

## 【0093】

例えば、ステロイドホルモンで転写誘導をすることができるプロモーターの下流に、外被タンパク質遺伝子を GFP 遺伝子に置換した組み換え T oMV の cDNA を導入して構築した発現ベクターが含まれていてもよい。かかる場合は、GFP 遺伝子と発現しようとする目的タンパク質遺伝子とを置換してもよいし、GFP 遺伝子に連結してもよい。GFP 遺伝子に連結した場合は、目的タンパク質が GFP との融合タンパク質として取得され、GFP の蛍光を指標として、発現をモニターしながらタンパク質生産が可能となる。

## 【0094】

また本発明にかかるタンパク質生産キットには、さらに、前述の転写誘導工程を行うためのホルモンが含まれていることも好ましい。該キットに含まれているホルモンについては、前述と同様、本発明にかかる形質転換細胞に導入された発現ベクターに含まれるプロモーターに応じて、適宜選択すればよい。例えば、ステロイドホルモン、エストロジェン、エクジソン等がある。この他、エタノールなどが転写誘導に利用できるため、該キットに含まれていてもよい。

## 【0095】

例えば後述の実施例において示すごとく、ステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターを持つ Ti プラスミド pTA7001 (Stu) をベースとしてタンパク発現ベクターを構築している場合は、ステロイドホルモンが含まれていることが好ましいといえる。

## 【0096】

また本発明にかかるタンパク質生産キットには、さらに、宿主となる生物由来細胞が含まれていてもよい。該キットに含まれる宿主細胞としては、生物由来細胞であれば特に限定されるものではなく、動物由来細胞であっても植物由来細胞であってもよい。また由来となる動物としては、特に限定されるものでないが、ヒト、サル、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、チャイニーズハムスター、ウシ、ウマ、ブタ、メダカやゼブラフィッシュ等の魚類、カイコ、夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 等が挙げら



れる。また由来となる植物としては、特に限定されるものではないが、イネ、シロイナズナ、オオムギ、コムギ、タバコ、トマト、キュウリ、ダイズ、ジャガイモ、トウモロコシ、ニチニチソウ、シロイヌナズナ、アルファルファが挙げられる。

【0097】

その他、枯草菌や乳酸菌などの菌類、酵母など単細胞生物が宿主細胞の例として挙げられる。

【0098】

また動物由来細胞の例としては特に限定されるものではないが、HeLa細胞、CHO細胞、メラノーマ細胞、マウス3T3細胞が挙げられる。また植物由来細胞の例としては、タバコBY-2細胞、ジャガイモ由来、イネ由来、サツマイモ由来、ダイズ由来、パセリ由来、シロイヌナズナ由来、コムギ由来、トウモロコシ由来細胞、ニチニチソウ由来細胞が挙げられる。

【0099】

そのほか本発明にかかるタンパク質生産キットには、また生物由来細胞を培養するための培地、および培養器等が含まれていてもよい。

【0100】

以上説示した発明によれば、大規模生産能力、高い生産効率、および安全性の高いタンパク質の生産系、および生産方法等を提供することが可能であることは明白である。

【0101】

なお本発明は、以上説示した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】

【0102】

以下本発明を実施例および図1～4に基づいてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0103】

〔実施例1：タバコBY-2細胞におけるステロイドホルモンによるタンパク質の誘導発現〕

＜発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)の構築＞

ウイルスベクターとして、外被タンパク質遺伝子をGFP遺伝子に置換したToMV変異体(ToMV-erG3(SF3))を用いた。なお、該ToMV-erG3(SF3)は、飯 哲夫博士(京都大学大学院)より分譲された。

【0104】

一方形質転換用ベクターとして、ステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターと転写因子(GVG)を持つTiプラスミドpTA7001(Stu)を用いた。該ベクターは、pTA7001の転写開始点に、PCR法を用いてStuIサイトを導入して作成した。なお該pTA7001は、Chua博士(Laboratory of Plant Molecular Biology, The Rockefeller University)より分譲された。

【0105】

次に、ToMV-erG3(SF3)のcDNAをpTA7001(Stu)のステロイドホルモンで転写誘導されるプロモーターの下流に導入し、発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)を構築した。該ベクターの構築を、さらに詳しく説示すれば、以下のとおりとなる。ToMV変異体のcDNAを含むpiL.erG3(SF3) (Atsushi Tamai and Tetsuo Meshi, "Tobamovirus movement protein transiently expressed in a single epidermal cell nctions beyond multiple plasmodesmata and spreads multicellularly in an infection-coupled manner" Molecular Plant-Microbe interaction (2001) 14: 6-134参照) からリンカーを用いてMluIサイトをAvrIIサイトに置換したプラスミドpiL.erG3(SF3)(Avr)を作成した。さらに、piL.erG3(SF3)を鋳型とし、PCR法を用いて5'末端にSnaBIサイトを導入したToMV cDNA 5'末端約1600塩基対のDNA断片を、SnaBI

およびSpe Iで切断した。この操作により得られた約1220塩基対のDNA断片を、pTA7001 (Stu) のStu IサイトとSpe Iサイトの間に挿入し、プラスミドpTA7001-ToMV5' -Speを作成した。pTA7001-ToMV5' -SpeをSpe IおよびAvr IIで切断した後、ToMV変異体cDNAの3'末端部分を含む約5200塩基対の断片を、pTA7001-ToMV5' -SpeのSpe Iサイトに挿入し、発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)を作成した。

#### 【0106】

図1に構築した発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)を示した。

#### 【0107】

<タバコBY-2細胞の形質転換>

前記発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)を、タバコBY-2細胞にアグロバクテリウム法によって導入した。具体的には、以下に示すとおりにした。

#### 【0108】

発現ベクターを、エレクトロポレーション法によってAgrobacterium Tumefaciens EHA105系統に導入した。これをカナマイシン(50mg/l)を含むAB sucrose培地で前培養を行った。次にタバコBY-2細胞と混合してシャーレに移し、26℃、暗所で42~48時間静置してタバコBY-2細胞を形質転換した。タバコBY-2細胞用培地にて洗浄した後、カルベニシリン(100mg/l)およびハイグロマイシン(20mg/l)を含むタバコBY-2細胞用固形培地に広げ、形質転換タバコBY-2細胞を増殖させた。

#### 【0109】

<ステロイドホルモンによる転写誘導>

取得した形質転換タバコBY-2細胞に対してステロイドホルモン処理(以下適宜DEX処理と称する)による転写誘導を行った。具体的には、形質転換タバコBY-2細胞の培養液に、ステロイドホルモン(デキサメタゾン)を30μMになるように加えて行った。

#### 【0110】

転写誘導の結果は、実体型蛍光顕微鏡装置(オリンパス社製)を用いて48時間後にGFP蛍光を観察した。また、転写誘導の48時間後のトータルRNAを、トライゾル法にて抽出し、ノーザン解析に用いた。ノーザン解析には、ToMVの3'非翻訳領域約200塩基に相補的なRNAプローブを用いた。プローブのラベリングには、ロシュ・ディアグノスティック社のDIG RNA Labelling Kitを用いて行った。検出には、同社のDIG Lumin escent Detection Kit、およびCDP-Starを用い、それぞれキットのマニュアルにしたがって行った。

#### 【0111】

図2に、DEX処理の有無におけるGFP遺伝子のmRNAの転写を、ノーザン解析により調べた結果を示す。図2より明らかなように、DEX処理によるGFP遺伝子のmRNAの転写誘導が確認できた。

#### 【0112】

図3に、DEX処理後の形質転換タバコBY-2細胞の蛍光顕微鏡観察結果を示した。GFPによる蛍光を検出した結果、図3に示すごとく、DEX処理によるGFPの誘導発現が確認できた。

#### 【0113】

<タバコBY-2細胞の前培養条件の検討>

継代培養後DEX処理までの前培養日数とGFPの発現率を調べた。方法は以下のようにして行った。

#### 【0114】

形質転換細胞を1/100量継代し、3日、5日および7日間前培養をした。そこにステロイドホルモン(デキサメタゾン)を30μMになるように加え、さらに48時間培養した後、ニコン社の正立型蛍光顕微鏡装置で細胞を観察した。GFP蛍光が認められる細胞と認められない細胞をそれぞれ計数し、発現率を算出した。

## 【0115】

図4に前培養日数と、GFPの発現率との関係を調べた結果を示した。その結果、5日間前培養した場合のGFPの発現率が、約4%と最も高い値を示した。このことは、増殖にともなう細胞の生理状態の変化が、ウイルス配列の複製およびGFPの発現に影響しているためと考えられる

以上説示したごとく、ステロイドホルモンで転写誘導をすることができるプロモーターの下流に、外被タンパク質遺伝子をGFP遺伝子に置換した組み換えToMVのcDNAを導入して構築した発現ベクターを、タバコBY-2細胞に導入した形質転換タバコBY-2細胞について、ステロイドホルモンによる転写誘導を行った結果、確かなウイルスRNAの増幅、GFPの誘導発現ができた。よって、本発明にかかる形質転換細胞、本発明にかかるタンパク質生産方法、および本発明にかかるタンパク質の生産キットを用いることによって、大規模生産能力および高い生産効率を有し、さらに安全性の高いタンパク質の生産が行えるということがいえる。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0116】

以上のように、本発明によれば、本発明は安価で大量にタンパク質を生産することが可能であり、得られたタンパク質は、医薬、化学工業、食品工業をはじめとする広範な分野に有効に利用できる。さらには、本発明にかかる形質転換細胞に導入された発現ベクター、宿主細胞等をタンパク質発現キットとして市販したりすることができるので、実験・研究用の試薬産業等にも応用することが可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0117】

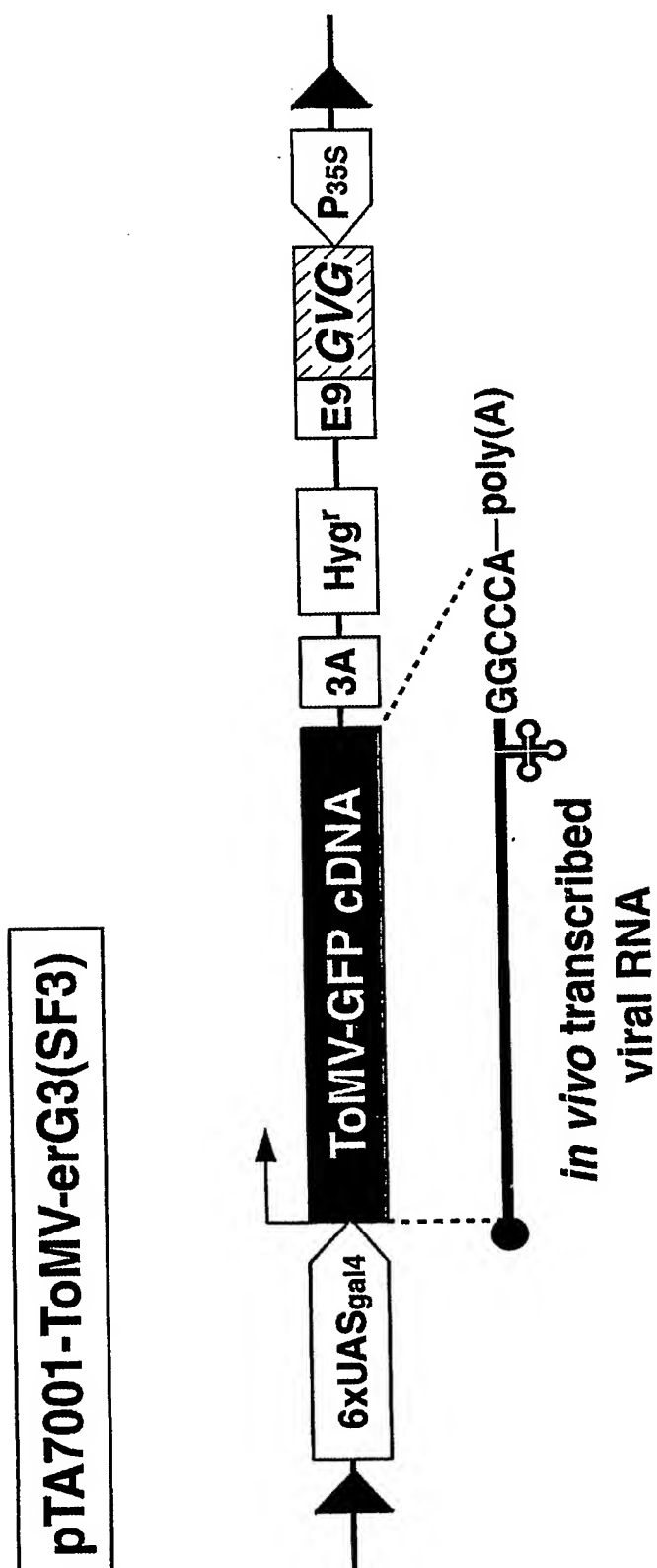
【図1】本発明にかかる形質転換細胞に導入される発現ベクターの一例であるpTA7001-ToMV-erG3(SF3)の構造を示す模式図である。

【図2】実施例において、発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)が導入された形質転換タバコBY-2細胞に対して、ステロイドホルモン処理(DEX処理)の有無におけるGFP遺伝子のmRNAの転写を、ノーザン解析により調べた結果を示す図である。

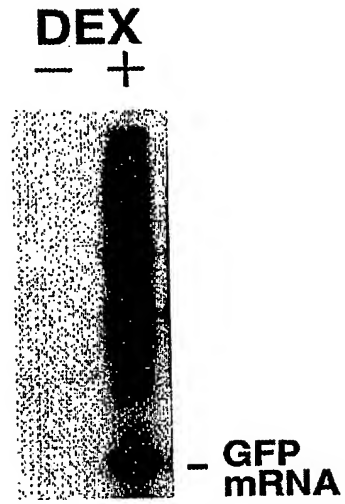
【図3】実施例において、発現ベクターpTA7001-ToMV-erG3(SF3)が導入された形質転換タバコBY-2細胞に対してステロイドホルモン処理(DEX処理)を行った際に、該細胞のGFP発現を蛍光顕微鏡にて観察した結果を示す図である。

【図4】実施例において、継代培養後DEX処理までの前培養日数(前培養3日目、5日目、7日目)とGFPの発現率の関係を調べた結果を示す折れ線グラフである。

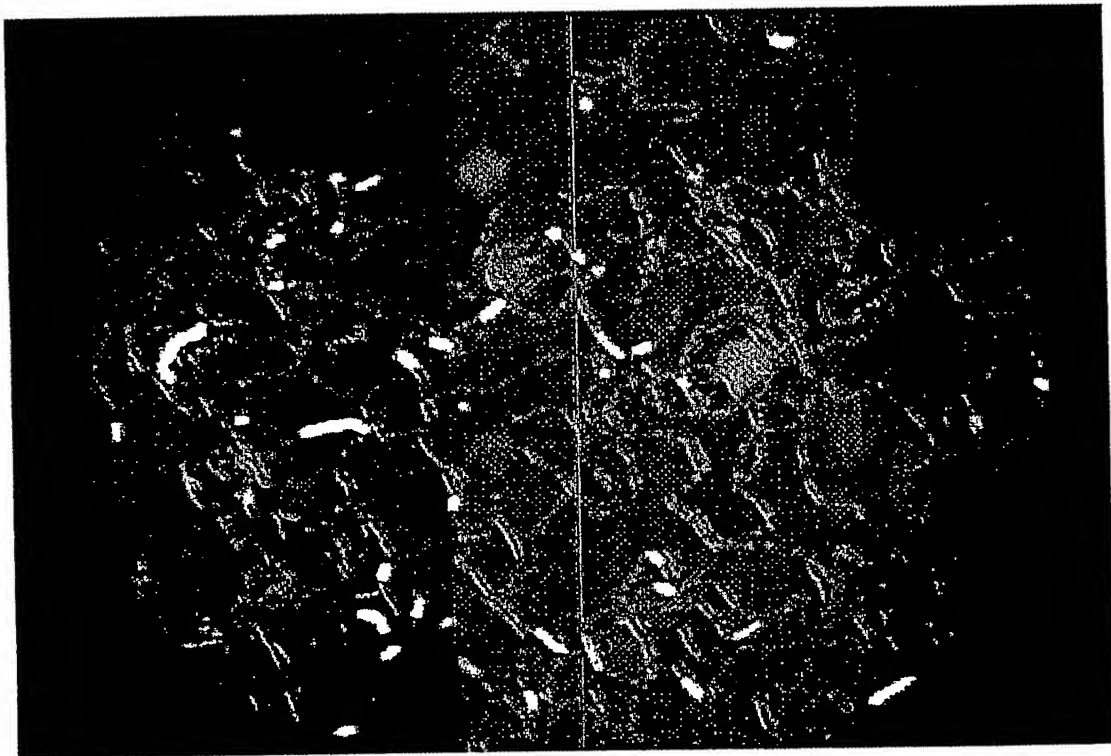
【書類名】 図面  
【図 1】



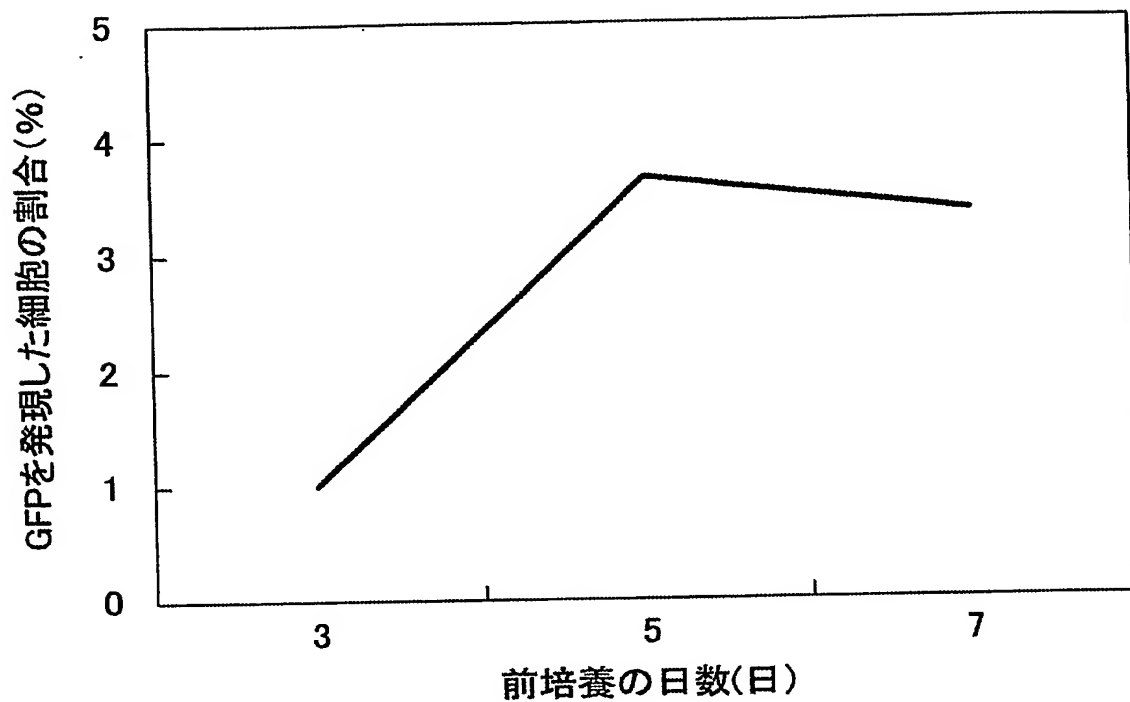
【図 2】



【図 3】



【図 4】



## 【書類名】 要約書

## 【要約】

【課題】 大規模生産能力および高い生産効率を有し、さらに安全性の高いタンパク質の生産系、およびタンパク質の生産方法、並びに該タンパク質の生産方法を行うためのキットを提供することにある。

【解決手段】 ウイルス抵抗性反応のサプレッサーを有するトマトモザイクウイルス (T o M V) の外被タンパク質遺伝子を G F P 遺伝子に置換した組み換え T o M V の c D N A を、ステロイドホルモンで転写誘導をすることができるプロモーターの下流に導入して構築した発現ベクターを構築する。該発現ベクターをタバコ B Y - 2 細胞に導入した形質転換タバコ B Y - 2 細胞に対して、ステロイドホルモンによる転写誘導を行うことにより、G F P 遺伝子の m R N A の増幅、および G F P の誘導発現が可能となる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 4 3 7 4 7
受付番号	5 0 3 0 1 6 3 3 7 6 5
書類名	特許願
担当官	植田 晴穂 6 9 9 2
作成日	平成 1 5 年 1 2 月 3 日

< 認定情報・付加情報 >

【手数料の表示】

【納付金額】 20,470円



特願 2003-343747

出願人履歴情報

識別番号

[501167644]

1. 変更年月日

2001年 4月24日

[変更理由]

新規登録

住所

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

氏名

独立行政法人農業生物資源研究所

特許庁 特許出願 第1551号

特願 2003-343747

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住 所  
氏 名

2003年10月 1日

新規登録

埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
独立行政法人 科学技術振興機構

2. 変更年月日  
[変更理由]

住 所  
氏 名

2004年 4月 1日

名称変更

埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
独立行政法人科学技術振興機構

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**